

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΧΡΗΣΗΣ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ABI 3500

Είδος: **ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA ABI 3500 (APPLIED BIOSYSTEMS)**

Χώρος εγκατάστασης: Εργαστήριο Γενετικής, κτίριο 8 Προκλινικών της Ιατρικής, 2^{ος} όροφος, Δωμ. 8.5.15

Υπεύθυνος: Νικόλαος Μαρινάκης, Επικ. Καθηγητής Γενετικής, email: nimarinak@med.duth.gr

Πλαίσιο απόκτησης: Πρόγραμμα ΕΣΠΑ για την προμήθεια νέου και αναβαθμισμένου εργαστηριακού και τεχνολογικού εξοπλισμού στο ΔΠΘ

Υπεύθυνος επικοινωνίας: Νικόλαος Μαρινάκης, email: nimarinak@med.duth.gr, Τηλ: 25510 30522

Περιγραφή

Το σύστημα Αυτόματου Γενετικού Αναλυτή του οίκου Applied Biosystems είναι ένα σύστημα ηλεκτροφόρησης 8 τριχοειδών, το οποίο χρησιμοποιεί το πολυμερές και καλύπτει ανάγκες μοριακής ανάλυσης DNA.

Ως υπεύθυνος ΕΥΑΠ ορίζεται ο Νικόλαος Μαρινάκης, Επίκουρος Καθηγητής του Τμήματος Ιατρικής, ο οποίος είναι υπεύθυνος για:

- την ομαλή και εύρυθμη λειτουργία του συστήματος,
- την εκπαίδευση και τον συντονισμό του ανθρώπινου και επιστημονικού δυναμικού,
- την επίλυση θεμάτων λειτουργίας του συστήματος,
- τη σύνταξη και την αναπροσαρμογή/τροποποίηση του παρόντος Παραρτήματος και
- την ενημέρωση της Συνέλευσης του Λειτουργικού-Κλινικοεργαστηριακού Τομέα για οποιοδήποτε θέμα προκύψει σχετικά με την εύρυθμη λειτουργία του συστήματος.

Ανθρώπινο Δυναμικό – Επιστημονικό Προσωπικό

Ως εξειδικευμένο Επιστημονικό Προσωπικό (ΕΠ) ορίζονται Υποψήφιοι Διδάκτορες, Μεταδιδάκτορες ή/και Ερευνητές του Εργαστηρίου Γενετικής και του Εργαστηρίου Βιολογίας του Τμήματος Ιατρικής που έχουν παρακολουθήσει ειδική εκπαίδευση χρήσης του συστήματος από τον ΕΥ.

Το ΕΠ είναι υπεύθυνο για:

- την εύρυθμη λειτουργία του συστήματος,
- την ανάπτυξη μεθόδων και ερευνητικών πρωτοκόλλων, σύμφωνα με τις ερευνητικές ανάγκες των χρηστών,
- την εκπαίδευση των χρηστών, η οποία δύναται να είναι ατομική ή ομαδική (π.χ. μέσω διαλέξεων, παρουσιάσεων, σεμινάρια/workshops, κλπ), ανάλογα με τις απαιτήσεις των μεθόδων/ερευνητικών πρωτοκόλλων, των χρηστών, κλπ, και
- την παροχή συμβουλευτικών υπηρεσιών όσον αφορά τον σχεδιασμό/επιλογή πρωτοκόλλων, την ανάλυση δεδομένων, κ.α.
- τηρεί κατάλογο των χρηστών και τους ενημερώνει ηλεκτρονικά για τυχόν προβλήματα, διαστήματα κατά τα οποία το όργανο δεν είναι διαθέσιμο κλπ

Το ΕΠ είναι υποχρεωμένο να σεβαστεί τον πειραματικό σχεδιασμό των χρηστών και να είναι διαθέσιμο για τυχόν υπερωρίες προκειμένου να βοηθήσει τους χρήστες στην αδιάλειπτη και απρόσκοπτη διεξαγωγή των πειραμάτων, αντίστοιχα, οι χρήστες, είναι υποχρεωμένα να σεβαστούν τα ωράρια του Επιστημονικού Προσωπικού.

Πρόσβαση και χρήση

Προϋπόθεση χρήσης του συστήματος αποτελεί η υποβολή σχετικού ηλεκτρονικού αιτήματος από τους χρήστες στον ΕΥ.

Το αίτημα θα περιλαμβάνεται σύντομη περιγραφή της πρότασης χρήσης (περιγραφή της μελέτης/μεθόδου/ερευνητικού πρωτοκόλλου και των σχετικών ειδικών απαιτήσεων, ορισμός υπεύθυνου χρήστη, κλπ).

Ο Υπεύθυνος του ΕΥΑΠ ή μέλος του εργαστηρίου επικοινωνεί με τον χρήστη ώστε να καθοριστούν οι λεπτομέρειες του πειραματικού πρωτοκόλλου και να προγραμματιστεί η πρόσβαση.

Ο χειρισμός του συστήματος γίνεται αποκλειστικά από μέλη του Εργαστηρίου.

Το κόστος των αναλωσίμων των πειραμάτων βαρύνει τους χρήστες.

Οι χρήστες αποδέχονται τον Πρότυπο Κανονισμό του ΕΥΑΠ του ΔΠΘ και οφείλουν να ακολουθούν τις Οδηγίες Χρήσης του συστήματος.

Τα χρονικό διάστημα αδιάλειπτης χρήσης από κάθε χρήστη δεν είναι δυνατό να υπερβαίνει τις 2 εργάσιμες ημέρες (συνολικά 20 ώρες). Σε αντίθετη περίπτωση, επιβάλλεται προηγούμενη επικοινωνία/συνεννόηση με το ΕΠ και τον Υπεύθυνο ΕΥΑΠ.

Οποιοδήποτε ατύχημα κατά την διάρκεια μιας επίσκεψης/έργου πρέπει να αναφέρεται στο προσωπικό και τον Υπεύθυνο του ΕΥΑΠ.

Κόστος συντήρησης

Το κόστος συντήρησης και επιδιόρθωσης βλαβών των συστημάτων της ΕΥΑΠ–ΤΜΔΙΗ αναλαμβάνει ο ΕΛΚΕ ΔΠΘ, μέσω υπάρχοντος ερευνητικού προγράμματος στήριξης των ΕΥΑΠ. Σε περίπτωση βλάβης και εφόσον η επιδιόρθωση από πόρους του ΔΠΘ για τα όργανα ανοικτής πρόσβασης δεν είναι δυνατή, το κόστος της επιδιόρθωσης βαρύνει τους χρήστες αναλογικά με το χρόνο χρήσης του συστήματος. Σε περίπτωση που η βλάβη προκλήθηκε από λάθος χειρισμό ερευνητών συγκεκριμένου Εργαστηρίου/Κλινικής, το κόστος έως και 100% του συνόλου βαρύνει το Εργαστήριο/Κλινική. Το ποσοστό αυτό καθορίζεται με απόφαση της επιταμελούς συντονιστικής επιτροπής μετά από διερεύνηση των συνθηκών που προκλήθηκε η βλάβη.

A/A	Όνομα Είδους	Σύντομη περιγραφή - Εφαρμογές	Κόστος	Υπεύθυνος επικοινωνίας Email Τηλέφωνο	Τμήμα	Θέση	Παράρτημα χρήσης του εξοπλισμού
	ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA ABI 3500 (APPLIED BIOSYSTEMS)	Σύστημα ηλεκτροφόρησης 8 τριχοειδών: Αλληλούχηση κατά Sanger, Fragment analysis	Το κόστος εξαρτάται από την εφαρμογή	Επικ. Καθηγητής Νικόλαος Μαρινάκης, nimarinak@med.duth.gr , τηλ 25510-30522 (77522)	Τμήμα Ιατρικής, ΔΠΘ	Εργαστήριο Γενετικής, 8.5.15	Το παράρτημα των οδηγιών χρήσης αποστέλλεται με email



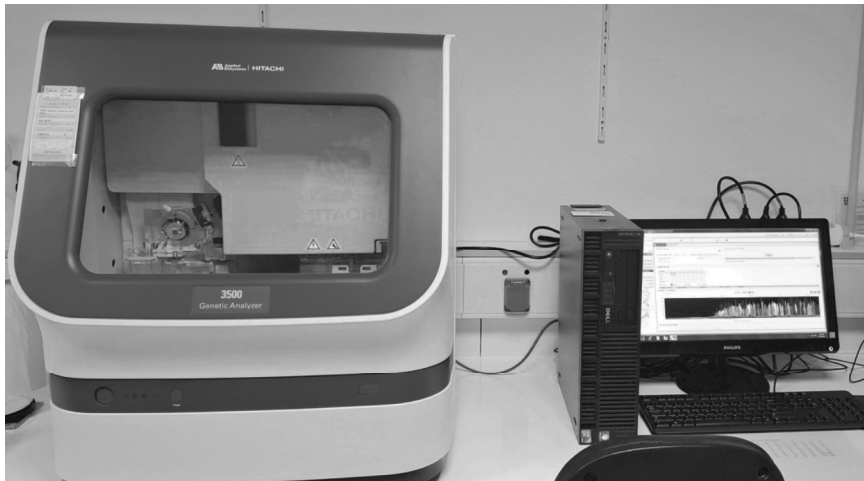
ΟΔΗΓΙΕΣ ΧΡΗΣΗΣ

ΑΥΤΟΜΑΤΟΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗΣ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ

DNA ABI 3500

Ο αναλυτής είναι ένα σύστημα ηλεκτροφόρησης 8 τριχοειδών, το οποίο χρησιμοποιεί το πολυμερές ΡΟΡ™. Τρέχει ανά δάδες (μια σειρά), το οποίο σημαίνει πως ανά φορά τρέχουν 8 δείγματα.

Το ABI είναι ένα μηχάνημα το οποίο καλύπτει τις ανάγκες του Εργαστηρίου Γενετικής, αλλά είναι και στη διάθεση και άλλων χρηστών. Βρίσκεται στον 2^ο όροφο του κτιρίου 8 των Προκλινικών της Ιατρικής, στο Εργαστήριο Γενετικής, στο Δωμάτιο 8.5.12. Το μηχάνημα μπορεί να καλύψει έως 2 ολόκληρα plates (24 σειρές ή 192 δείγματα) μέσα σε ένα 24ώρο. Η χρήση του αναλυτή γίνεται αποκλειστικά από πιστοποιημένους χειριστές.



Υπεύθυνος αναλυτή: Νικόλαος Μαρινάκης, Επικ. Καθηγητής Γενετικής, Ιατρική, ΔΠΘ



ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΠΡΟΔΙΑΓΡΑΦΕΣ ΤΟΥ ΑΥΤΟΜΑΤΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΑΝΑΛΥΤΗ ΑΝΑΓΝΩΣΗΣ ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑΣ DNA

Ο αυτόματος γενετικός αναλυτής ανάγνωσης αλληλουχίας DNA ο οποίος είναι απαραίτητος για τη διενέργεια αναλύσεων:

- Είναι πλήρους αυτόματης λειτουργίας & νέας τεχνολογίας για την ανάλυση DNA με 8 τριχοειδή (capillaries),
- Υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού ακολουθίας DNA \geq από 850 βάσεις με μεγάλη ακρίβεια (sequencing)
- Υπάρχει η δυνατότητα προσδιορισμού μήκους τμημάτων DNA με μεγάλη ακρίβεια (fragment analysis).
- Είναι πλήρως αυτόματος από την ταυτόχρονη φόρτωση των δειγμάτων έως το προσδιορισμό της ακολουθίας ή την ανάλυση μήκους τμημάτων
- Χρησιμοποιεί 6 φθορίζουσες χρωστικές και να μπορεί να ανιχνεύσει φθορισμό από τις φθορίζουσες χρωστικές FAM, HEX, TAMRA, ROX, LIZ,
- Παρέχει τη μέγιστη δυνατή ομοιομορφία θερμοκρασίας στο χώρο διεξαγωγής των αναλύσεων ώστε να εμποδίζεται ανομοιομορφία θερμοκρασίας στις διάφορες θέσεις της μικροπλάκας καθώς και εξελιγμένο σύστημα θερμοκρασιακού ελέγχου.
- Πραγματοποιεί αυτόματη φόρτωση δειγμάτων από δειγματολήπτη με μία πλατφόρμα, που να δέχεται 2 X 96 ή 1 X 384-θέσεων μικροπλάκες ώστε να εξασφαλίζεται η μέγιστη αποδοτικότητα
- Η εκπομπή σήματος επιτυγχάνεται μέσω laser στερεάς κατάστασης με μεγάλο χρόνο ζωής
- Η ταχύτητα του αναλυτή για την επεξεργασία 8 δειγμάτων είναι ως 40 λεπτά για τις εφαρμογές sequencing τουλάχιστον 600bp και για fragment analysis
- Ο αναλυτής διαθέτει σύστημα αναγνώρισης Ετικετών Ραδιοκυμάτων (RFID) , ώστε να επιτυγχάνεται η αυτόματη αναγνώριση των αναλωσίμων και η παρακολούθηση της χρήσης και κατανάλωσης αυτών.
- Για την συλλογή και αποθήκευση των δεδομένων, διατίθεται σύγχρονο υπολογιστικό σύστημα σε περιβάλλον Windows 7
- Συνοδεύεται από πακέτο προγραμμάτων επεξεργασίας και ανάλυσης δεδομένων για σύγκριση αλληλουχιών βάσεων (comparative sequencing) και ανίχνευση σημειακών μεταλλάξεων & ετεροζυγωτών, για την ανάλυση rRNA και μιτοχονδριακού DNA, για χαρτογράφηση σύνδεσης (linkage mapping), για ποσοτικοποίηση δειγμάτων και μέτρησης του μήκους τους (fragment sizing).
- Παρέχονται από τον προμηθευτή τα αναλώσιμα του αναλυτή που είναι αναγκαία για την διεξαγωγή των ζητούμενων αναλύσεων.
- Υπάρχουν άμεσα διαθέσιμα ανταλλακτικά.
- Παρέχεται πλήρης τεχνική υποστήριξη και άμεση ανταπόκριση από ειδικευμένο τεχνικό προσωπικό εκπαιδευμένο και πιστοποιημένο από τον κατασκευαστή.
- Συνοδεύεται από σταθεροποιητή τάσης (UPS).



ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΑΝΑΛΥΤΗ

Άνοιγμα-Έναρξη:

- Άνοιγμα του Η/Υ από το κουμπί της μονάδας, Ctrl+Alt+Del έως την εμφάνιση των χρηστών.
- Άνοιγμα του αναλυτή από το κουμπί ON/OFF μέχρι το πορτοκαλί φως να γίνει πράσινο.
- Σύνδεση στο λογαριασμό του χρήστη Administrator με κωδικό: Administrator.
- Αναμονή μέχρι να φορτωθούν τα προγράμματα, δηλαδή μέχρι να εμφανιστεί πράσινο check στην κλεψύδρα κάτω δεξιά στην οθόνη του υπολογιστή.
- Άνοιγμα του προγράμματος ABI 3500 από το εικονίδιο στην επιφάνεια εργασίας
- Η πρώτη οθόνη του προγράμματος είναι το Dashboard, όπου βρίσκονται όλες οι πληροφορίες για την επάρκεια των αντιδραστηρίων, Πολυμερές (POP), Ρυθμιστικό δυάλυμα Ανόδου/Καθόδου, Τριχοειδή (Capillaries).
- Κατά την έναρξη του αναλυτή ή μετά από 6-8 ώρες μη χρήσης, προτίνεται να γίνεται fill array με πολυμερές.
Maintenance-> Maintenance wizards-> Fill array with polymer -> Ακολουθούνται οι οδηγίες όπως εμφανίζονται από το σύστημα.
- Επιστροφή στο Dashboard

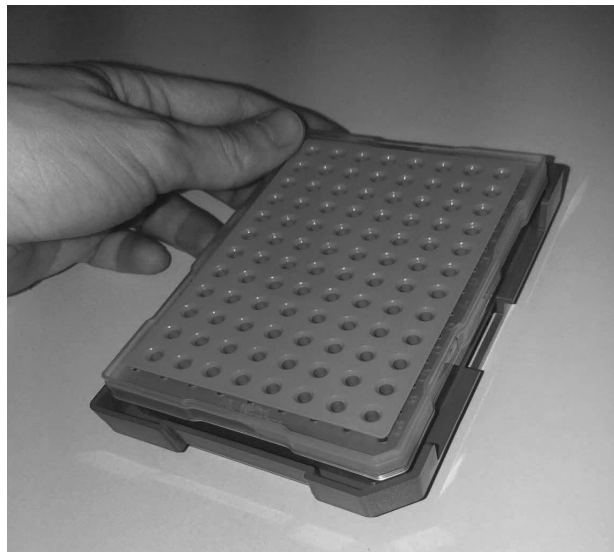
Δημιουργία ανάλυσης:

- Από την οθόνη του Dashboard: Create new plate
- Συμπληρώνεις στην πρώτη σειρά: MG 2019-01-29pL2020
- Επιλέγεις στη Δεύτερη σειρά Sequencing ή Fragment (Fragment ή MLPA) ανάλογα με το είδος της ανάλυσης
- Assign plate contents
- Συμπληρώνεις τα στοιχεία στην οθόνη του plate ανάλογα με τη φόρμα που συνοδεύει το plate.
- Από το Assays επιλέγεις add from library και ανάλογα με το είδος ανάλυσης και δειγμάτων επιλέγεις:

Sequencing	Programme
Προϊόντα 500-700bp	POP7_3.1SEQ_50cm
Προϊόντα μεγαλύτερα από 700bp	POP7_3.1SEQ_50cm 2500sec
Προϊόντα μικρότερα από 500bp	POP7_3.1SEQ_50cm_MINI
Fragment/MLPA	
Προϊόντα μέχρι ~500bp LIZ	AB Fragment Analysis (1ο εργοστ.)
Προϊόντα μεγαλύτερα από 700bp	Fragment_POP7_(inj_2.5KV_20_RUN 3000s)



- Από το File name conventions επιλέγεις add from library και επιλέγεις WELL-SAMPLE ή Sample-well ανάλογα με το πως θέλεις να εμφανίζονται τα ονόματα των πηγαδιών στα αποτελέσματα.
- Από το Results Groups επιλέγεις add from library και επιλέγεις τον χρήστη της ανάλυσης.
- Επιλέγεις τα κελιά που αντιστοιχούν στο πιάτο και τσεκάρεις αυτά που επέλεξες από την κάθε βιβλιοθήκη.
- Τοποθετείς το πιάτο με στο ειδικό rack όπως στη φωτο και το κλείνεις με το ειδικό άσπρο καπάκι.



- Καλείς τη βάση του αναλυτή πατώντας το κουμπί TRAY που βρίσκεται στον αναλυτή και ανοίγεις την πόρτα.
- Τοποθετείς το rack στη βάση του αναλυτή όπως στη φωτο και κλείνεις την πόρτα.





- Από τον υπολογιστή επιλέγεις Link Plate και σε οδηγεί στην καρτέλα Load plates, όπου συμπληρώνεις το όνομα του φακέλου που θα αποθηκευτούν τα δεδομένα, Run 2019-01-29pL2020 16.00
- Επιλέγεις Create injections και σε οδηγεί στην καρτέλα Preview run όπου ελέγχεις αν έχεις επιλέξει σωστά το πρόγραμμα, τα πηγάδια, το χρήστη.
- Επιλέγεις Start run και η ανάλυση ξεκινά.
- Στη φόρμα του πιάτου αναγράφεται: GL 2019-01-29pL2020 και Run 2019-01-29pL2020 16.00.
- Στη φόρμα χρήσης του ABI μπροστά από τον υπολογιστή συμπληρώνονται οι σειρές που χρησιμοποιήθηκαν και από ποιόν χρήστη.

Πάνω δεξιά βλέπεις τη χρονική διάρκεια της ανάλυσης.

Τέλος ανάλυσης-Παραλαβή δεδομένων:

- Μετά το τέλος της ανάλυσης οι σειρές στην καρτέλα Monitor run είναι μπλε.
- Από την καρτέλα Load plates επιλέγεις unlink και βγάζεις το πιάτο από τη βάση και το rack, όπως τα έβαλες.
- Από το φάκελο Data στην επιφάνεια εργασίας, ανοίγεις το φάκελο Medical genetics και κάνεις αντιγραφή/επικόλληση των φακέλων που θέλεις να παραλάβεις σε CD και Burn to disk.
- Τα δεδομένα μεταφέρονται στο φάκελο Public->ABI3500->DATA->ΕΤΟΣ

Τα δεδομένα μπορούν να αναλυθούν με κατάλληλα προγράμματα (Chromas, BioEdit, GeneMarker κ.α.).

Αναλώσιμα:

Ρυθμιστικά διαλύματα ανόδου/καθόδου:

- Μετά το πέρας συγκεκριμένου αριθμού αναλύσεων ή ημερομηνία λήξης των διαλυμάτων αυτά πρέπει να ανανεωθούν.
- Για την κάθοδο πατάς το κουμπί TRAY και βγάζεις το διαφανές δοχείο από τη βάση.
- Βγάζεις τα γκρι καπάκια και τα τοποθετείς στο νέο.
- Τοποθετείς το νέο δοχείο στη βάση του αναλυτή.
- Στην κεφαλή του αναλυτή αφαιρείς με προσοχή χωρίς να αγγίζεις τη μύτη της ανόδου το διαφανές δοχείο.
- Αφού έχεις αφαιρέσει το υγρό από το μικρό μέρος του δοχείου στο μεγάλο, τοποθετείς το νέο δοχείο στις κατάλληλες εγκοπές με προσοχή.
- Επιλέγεις Refresh από το Dashboard του υπολογιστή.

Τα διαλύματα βρίσκονται στο ψυγείο στο Εργαστήριο Γενετικής.



Πολυμερές POP7:

- Μετά το πέρας συγκεκριμένου αριθμού αναλύσεων ή ημερομηνία λήξης του πολυμερούς αυτό πρέπει να ανανεωθεί.
- Από το Dashboard επιλέγεις Maintenance->Maintenance wizards-> Replenish polymer
- Ακολουθείς τις οδηγίες όπως εμφανίζονται στην οθόνη.

Τα διαλύματα βρίσκονται στο ψυγείο στο Εργαστήριο Γενετικής.

Τριχοειδή:

- Μετά το πέρας συγκεκριμένου αριθμού αναλύσεων ή ημερομηνία λήξης του τριχοειδούς αυτό πρέπει να ανανεωθεί.
- Από το Dashboard επιλέγεις Maintenance->Maintenance wizards->Install Capillary Array
- Μετά την αλλαγή των τριχοειδών απαιτείται calibration. Από την καρτέλα Calibrate επιλέγεις Spatial για τον έλεγχο των τριχοειδών.
- Μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου αποδέχεσαι ή όχι τα αποτελέσματα.
- Υπάρχει δυνατότητα να επαναληφθεί το Spatial έως το intensity να είναι πάνω από 6000.
- Μετά το Spatial ακολουθούν τα Spectral calibrations ανάλογα με το είδος των αναλύσεων του εργαστηρίου επιλέγοντας στην καρτέλα Spectral

Spectral calibration για sequencing: Ετοιμάζεις το Sequence standard σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου και το αναλύεις στον αναλυτή επιλέγοντας Dye Set Z και chemistry sequenceStandard

Spectral calibration για LIZ/ROX: Ετοιμάζεις το spectral σύμφωνα με τις οδηγίες του πρωτοκόλλου και το αναλύεις στον αναλυτή επιλέγοντας Dye Set DS-30/G5 και chemistry matrix standard.

- Τα αποδεκτά spectral calibrations είναι όταν τα capillaries έχουν πράσινο ή κίτρινο χρώμα.

Τα διαλύματα βρίσκονται στο ψυγείο στο Εργαστήριο Γενετικής.

Αναλυτικές οδηγίες για τη χρήση, συντήρηση, σφάλματα κ.α. του αναλυτή βρίσκονται στο εργασιακό εγχειρίδιο του αναλυτή.